

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dottorato di Ricerca in

**SCIENZE DELLO SVILUPPO E DEL
MOVIMENTO UMANO**

Progetto 1

Discipline delle attività motorie e sportive

XXIV Ciclo

Settore Concorsuale di afferenza: 06/F4 Malattie Apparato Locomotore e
medicina fisica e riabilitativa

Settore Scientifico disciplinare: MED/33 Malattie Apparato Locomotore

TITOLO TESI

**TRATTAMENTO DELLE LESIONI
OSTEOCONDRALE DI GRADO I E II
MEDIANTE INFILTRAZIONE INTRA-
ARTICOLARE DI FATTORI DI CRESCITA
AUTOLOGHI
(PLASMA RICH IN PLATELETS)**

Presentata da Dott. Roberto Bevoni

Coordinatore Dottorato Chiar.mo

Relatore Chiar.mo

Prof. Salvatore Squatrito

Prof. Maurilio Marcacci

Esame finale anno 2012

**TRATTAMENTO DELLE LESIONI OSTEOCONDRALE DI
GRADO I E II MEDIANTE INFILTRAZIONE INTRA-
ARTICOLARE DI FATTORI DI CRESCITA AUTOLOGHI
(PLASMA RICH IN PLATELETS)**

INDICE

INTRODUZIONE.....	PAG. 3
LA CARTILAGINE	PAG. 5
COMPONENTI DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE	PAG. 9
LESIONI DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE	PAG. 13
TRATTAMENTO DELLE LESIONI OSTEOCONDRALE.....	PAG. 18
PLASMA RICH PLATELETS.....	PAG. 22
SCELTA DEL TIPO DI STUDIO ANIMALE	PAG. 29
MATERIALI E METODI.....	PAG. 39
RISULTATI.....	PAG. 42
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	PAG. 46
BIBLIOGRAFIA.....	PAG. 48

INTRODUZIONE

Le lesioni traumatiche e degenerative della cartilagine articolare sono una causa sempre più frequente di dolore e limitazione funzionale. Cambiamenti culturali e sociali hanno portato ad un aumento dei praticanti di attività sportive. L'attività sportiva in se è un fattore migliorativo per il fisico umano, in quanto si hanno modifiche proattive che incrementano il metabolismo e le capacità del corpo a reagire agli stimoli esterni. Tuttavia l'attività fisica prolungata può portare a sovraccarichi funzionali e ad incidenti sportivi.

L'artrosi è la più frequente patologia articolare e può essere primitiva o secondaria a lesioni post-traumatiche. E' caratterizzata da dolore e limitazione funzionale e negli stadi avanzati può portare a contratture, atrofia muscolare e a deviazioni assiali. Le articolazioni dell'arto inferiore più coinvolte sono in ordine di frequenza il ginocchio, l'anca e la caviglia, naturalmente possono essere coinvolte tutte le articolazioni.

I cambiamenti iniziali coinvolgono la cartilagine articolare e in seguito si associano modifiche a carico dell'osso subcondrale.^{1,2} Recentemente molti studi si sono focalizzati sul ruolo dell'osso subcondrale come causa principale della sintomatologia.^{3,4,5,6}

La comprensione dei cambiamenti iniziali dell'osteoartrosi sono importanti, poiché si potrebbe attuare una strategia per rallentare la progressione di questo processo, specialmente nel paziente giovane. L'etiologia dell'osteoartrosi primaria è multifattoriale e non del tutto compresa. L'età del paziente è un fattore importante, vi è altresì una forte correlazione con fattori intrinseci come malallineamenti e sovraccarichi funzionali.⁷ E' stato ben documentato come la cartilagine nell'uomo abbia una capacità di autoriparazione ridotta, dovuta alla scarsità dell'attività di mitosi dei condrociti e alla mancanza di vascolarizzazione.

In questo tessuto molto specializzato nell'assorbimento dei carichi con un'omeostasi dell'ambiente intraarticolare molto delicata, i grandi difetti cartilaginei non riescono a guarire spontaneamente e vanno incontro a progressiva degenerazione e all'instaurarsi dell'osteoartrosi.⁸

Negli ultimi anni la ricerca sulla cartilagine si è concentrata sullo studio di sistemi per la sostituzione della cartilagine degenerata, e su sistemi di stimolazione chimica e biofisica, per il miglioramento dell'omeostasi articolare e della rigenerazione cartilaginea.

Il trapianto di condrociti autologhi e il trapianto osteocondrale autologo sono diventate metodiche sempre più diffuse nella pratica clinica, e hanno dimostrato di promuovere la ricostituzione del pool cartilagineo, in pazienti affetti da lesioni osteocondrali isolate.⁹ Sebbene vi siano svantaggi come la limitata disponibilità del tessuto nella mosaicoplastica, e la necessità nel trapianto di condrociti autologhi, di sottoporre il paziente a due interventi, uno per il prelievo cartilagineo necessario alla coltura dei condrociti e uno per l'inserimento della cartilagine neoformata all'interno della lesione.¹⁰

La ricerca sta cercando di comprendere meglio i meccanismi di riparazione cartilaginea e come utilizzare la medicina rigenerativa per incrementare la risposta del nostro organismo, in caso di traumi acuti o di tecniche chirurgiche riparative. Gli studi preclinici effettuati su animali si sono dimostrati fondamentali per valutare la reale efficacia dei trattamenti utilizzati nelle lesioni cartilaginee focali. Gli animali comunemente utilizzati per questo tipo di studi sono cavie, conigli, cani, capre, maiali e cavalli. Ognuno di questi presenta vantaggi e svantaggi. Gli animali piccoli sono più semplici da utilizzare, con minor costi e minori difficoltà di gestione, per questo ci siamo orientati verso l'utilizzo di conigli, che rappresentano un buon compromesso tra qualità dello studio e facilità di gestione.

Scopo di questo studio è la valutazione dell'efficacia dei fattori di crescita (plasma rich in platelets PRP) nelle lesioni osteocondrali di grado 1 e 2 in un modello sperimentale animale (coniglio).

LA CARTILAGINE

I tessuti cartilaginei sono connettivi nei quali la sostanza intercellulare è notevolmente densa, compatta e consistente, tanto da imprigionare al suo interno le cellule dette **condrociti**.

Questi, all'interno delle nicchie che li imprigionano, possono andare incontro una o due volte a mitosi, per cui spesso si osservano piccoli gruppi di due, tre o quattro cellule, tutte figlie della stessa madre, detti gruppi isògeni.¹¹

La cartilagine articolare ha una bassa attività metabolica e sebbene i condrociti possano andare incontro a mitosi, l'attività di replicazione è quasi assente dato l'alto grado di specializzazione di queste cellule.¹²

I condrociti rappresentano l'1% del volume della cartilagine articolare dell'uomo adulto ed è responsabile della sintesi della matrice cartilaginea. Il meccanismo che controlla il bilancio tra sintesi e degradazione rimane ancora non del tutto chiaro, ma le citochine con ruolo anabolico o catabolico sembrano avere un ruolo importante.¹³

La cartilagine articolare per svolgere la sua funzione fisiologica, deve essere elastica e resistente alla compressione. Le proprietà meccaniche della cartilagine dipendono dalla matrice extracellulare, la quale è composta di un fluido tissutale e di una struttura di macromolecole costituite da collagene tipo II, proteoglicani, proteine non-collageniche e glicoproteine, tutte prodotte nella giusta quantità e organizzate in forma altamente ordinata dai condrociti. La matrice di collagene conferisce alla cartilagine la sua forma e le proprietà di resistenza meccanica. I proteoglicani e le proteine non-collageniche servono a collegare questo network, e a stabilizzare la struttura macromolecolare della matrice.

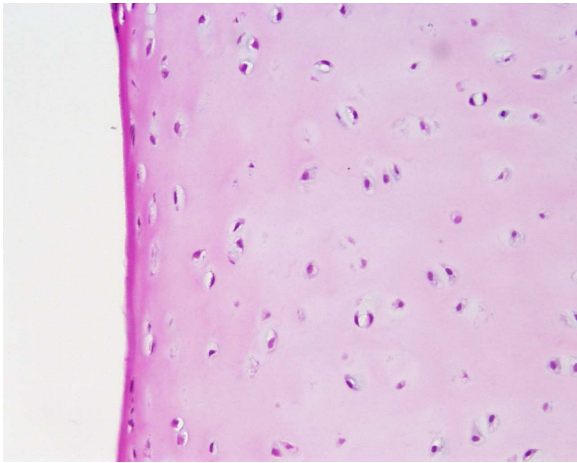


Fig. 1: Cartilagine articolare zona superficiale

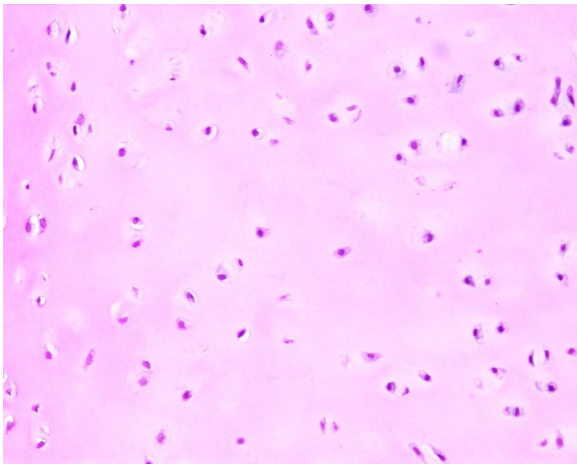


Fig.2 Cartilagine articolare zona Intermedia

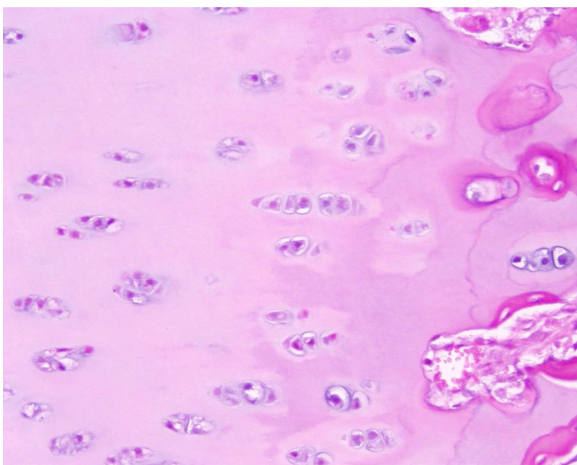


Fig. 3 Cartilagine articolare zona profonda

L'elemento più rappresentativo della cartilagine è il condroitinsolfato, le cui molecole sono stabilmente legate da numerosi ponti disolfuro. Le cartilagini non sono vascolarizzate, per cui le cellule possono portare a termine i loro scambi metabolici solo per diffusione attraverso la sostanza extracellulare.

Secondo la quantità di fibre collagene ed elastiche presenti, si distinguono tre tipi di tessuto cartilagineo:

1. **CARTILAGINE IALINA**
2. **CARTILAGINE FIBROSA**
3. **CARTILAGINE ELASTICA**

1. CARTILAGINE IALINA: di colore bianco-bluastro, è ricca di sostanza intercellulare in cui sono sparse fibre collagene prive di un particolare orientamento e la matrice intercellulare si presenta piuttosto omogenea, anche se diversamente colorabile, di particolare consistenza per la ricchezza in condroitinsolfato e acido ialuronico che ne assicura l'idratazione. Le lacune contengono gruppi isogeni formati da piccoli gruppi di cellule o rotondeggianti. Come in tutti i tipi di cartilagine non sono presenti vasi sanguigni e i processi metabolici cellulari sono assicurati dalla diffusione dei materiali nella matrice.

Ogni formazione cartilaginea è avvolta dal pericondrio, una lamina di tessuto connettivo fibrillare denso a fasci intrecciati riccamente vascolarizzata, che durante il periodo di accrescimento contiene giovani fibroblasti capaci di trasformarsi in condroblasti e successivamente in condrociti. La cartilagine ialina riveste le superfici articolari ossee delle diartrosi, costituisce le cartilagini costali e lo scheletro della piramide nasale, della laringe, bronchi e trachea. Anche lo scheletro del feto è costituito da cartilagine ialina, che sarà sostituita da tessuto osseo durante i processi di ossificazione.

2. CARTILAGINE FIBROSA: biancastra, priva di pericondrio, ha la matrice particolarmente ricca di fibre collagene orientate. Può sopportare grandi sollecitazioni in trazione ed è più "rigida" rispetto alle altre. Costituisce **dischi intervertebrali**, menischi articolari, inserzioni tendinee e il tessuto di unione delle ossa in tutte le sinfisi.

3. CARTILAGINE ELASTICA: di colore giallo - opaca, elastica e flessibile, presenta una matrice ricchissima di fibre elastiche, che rendono le strutture cartilaginee pieghevoli e atte a sopportare sollecitazioni angolari senza rotture. Non subisce calcificazione se non in rarissime circostanze. Costituisce lo scheletro del padiglione auricolare, della cartilagine epiglottide, della tuba di Eustachio.

Nello sviluppo post-natale gran parte dello scheletro è formato da cartilagine che in seguito, con l'accrescimento, viene sostituita da tessuto osseo.

COMPONENTI DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

La cartilagine articolare è organizzata in 4 zone che differiscono in contenuto di collagene, organizzazione delle fibre, contenuto in proteoglicani e contenuto di acqua, oltre alla forma e alla grandezza dei condrociti (Fig.4).¹⁴

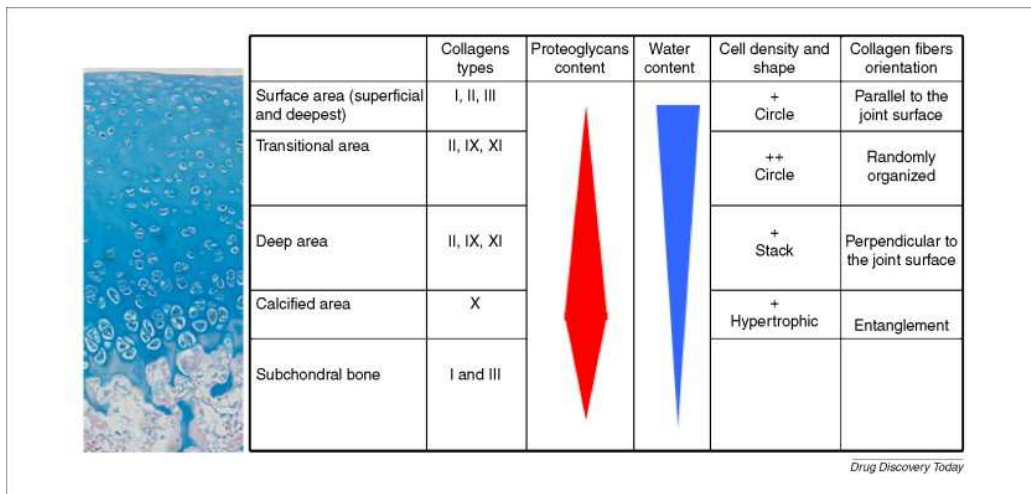


Fig. 4 Differenze istologiche all'interno di un campione di cartilagine articolare del ginocchio (Colorazione Alcian Blue)

- COLLAGENE:

Il collagene forma lo "scheletro" della cartilagine articolare ed è responsabile dello scarico delle forze di trazione e di taglio.

Un'analisi strutturale condotta nelle zone superficiali, medie e profonde della cartilagine indica come abbia una distribuzione quantitativa e tridimensionale differente.

Il collagene si organizza in colonne fibrose a loro volta costituite da microfibrille eterogenee da un punto di vista molecolare. Il collagene è presente nelle sue principali famiglie genetiche: il tipo II è il maggioritario, mentre il tipo I e III sono presenti in quantità differenti nelle varie età, il IX e X, nonostante costituiscano una quota minoritaria svolgono un ruolo meccanico di sostegno fondamentale.¹⁵

Le varie classi molecolari possiedono proprietà biomeccaniche, che le rendono paragonabili a "moduli" di costruzione, dotati di caratteristiche peculiari.

La struttura portante della cartilagine è pertanto assimilabile più che a un'armatura o telaio fibroso, a una "matrice tridimensionale" che associa alla deformabilità un'importante elasticità residua.

- CONDROCITI:

I condrociti sono l'unica popolazione cellulare della cartilagine articolare e ricevono i nutrienti dai vasi dell'osso subcondrale. Il condrocito produce proteoglicani e acido ialuronico che, unendosi, formano la matrice amorfa della cartilagine (base per la sopportazione del "carico"). Le fibre collagene e i proteoglicani danno rigidità, elasticità e forma alla cartilagine. (Fig. 5)

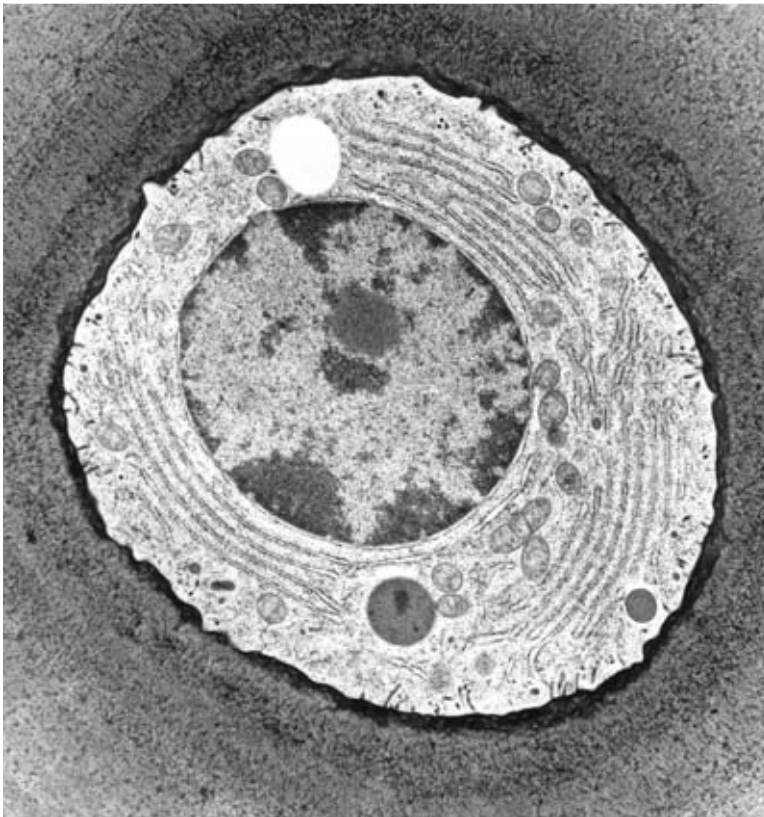


Fig. 5 Immagine al microscopio elettronico di un condrocito della cartilagine articolare

Nel 1987 A. Poole ha proposto una rilettura della morfologia della cartilagine articolare proponendo la "teoria del condrone" secondo cui i singoli condrociti e la matrice circostante (territoriale e pericellulare) costituiscono unità

morfofunzionali autonome dette "condroni". Ogni "unità condronica" è costituita da:

- a) una capsula, la cui parete è data da un fitto intreccio di fibre di collagene disposte a costituire lamine sovrapposte a più strati;
- b) una matrice pericellulare ad alta rifrangenza, plastica e flessibile costituita prevalentemente da un miscuglio di proteoglicani;
- c) uno o più condrociti, cellule protodifferenziate impegnate nella sintesi e nella manutenzione dei costituenti molecolari della matrice attraverso un rigido controllo della fase anabolica e di quella catabolica.

E' stato ipotizzato che ogni unità condronica funzioni come un "trasduttore" biomeccanico capace di regolare la propria attività metabolica in relazione al complesso delle sollecitazioni meccaniche che raggiungono la cartilagine articolare.

- PROTEOGLICANI:

Gli spazi molecolari definiti dalla rete collagenica sono occupati dai complessi "proteoglicano-ialuronico" responsabili di antagonizzare le forze di compressione. I proteoglicani costituiscono una sorta di "spugna" porosa fortemente idratata, plastica e flessibile, formata da un complesso intreccio di subunità costituite da una "core protein" alla quale si legano numerosi glicosaminoglicani (GAGs) costituiti da molteplici unità disaccaridiche (condroitin 4 e 6 solfato, cheratan solfato).

I gruppi solfato e carbossilico conferiscono un'alta concentrazione di cariche negative alle molecole proteoglicaniche che sono tra loro interconnesse, attraverso una "link protein" ad un lungo filamento di acido ialuronico. Ogni macromolecola proteoglicanica costituisce un dominio incompressibile dal momento che la resistenza alle forze pressorie è direttamente proporzionale alle interazioni intramolecolari tra le cariche negative dei GAGs che tengono a respingersi se sottoposti a pressione. Grazie al complesso delle reazioni elettrostatiche esercitate dai singoli GAGs, i complessi proteoglicanici possono

legare acqua che viene ceduta sotto carico e riassunta al termine della compressione, esattamente come una spugna.

Per questi motivi la capacità di sopportare carichi pressori è direttamente correlata ai livelli di proteoglicani: la loro diminuzione percentuale può quindi determinare l'insorgenza di sollecitazioni che portano inevitabilmente al collasso strutturale.

LESIONI DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

Le lesioni della cartilagine articolare, post-traumatiche o degenerative, rappresentano una patologia comune, che interessa un gran numero di persone, sportivi e non, e costituisce la fase iniziale della patologia degenerativa artrosica. Le lesioni cartilaginee possono essere distinte in:

- **Lesioni condrali** (coinvolgono esclusivamente la cartilagine articolare)
- **Lesioni condrali miste** (associate ad alterazioni dell'osso subcondrale, sede d'impianto della cartilagine articolare)

Le **LESIONI CARTILAGINEE POST-TRAUMATICHE** occorrono in seguito a traumi diretti o indiretti; sono caratterizzate da "microfratture" delle trabecole dell'osso subcondrale.

Le **LESIONI DEGENERATIVE** si manifestano solitamente come osteoartrosi. Tale patologia interessa tutti i costituenti dell'articolazione: cartilagine articolare, osso, membrana sinoviale e capsula articolare. Le prime alterazioni strutturali consistono nella necrosi delle cellule cartilaginee più superficiali e in seguito anche della matrice extracellulare. Tipica di questa fase è l'**erosione** e la conseguente **ulcerazione** della cartilagine, con conseguente "esposizione" dell'osso che appare più addensato (nei radiogrammi le superfici articolari sono più bianche rispetto al resto dell'osso). Ciò causa la formazione di osteofiti e cavità geodiche su entrambi i versanti articolari. L'osteoartrosi e l'invecchiamento della cartilagine si differenziano per il diverso contenuto idrico: l'idratazione è il primo segno di una progressione irreversibile verso la degenerazione cartilaginea. Altra differenza è nell'attività enzimatica **degradativa**, che appare aumentata nell'artrosi, ma non nell'invecchiamento della cartilagine.

Anche la **sedentarietà** e la limitazione del movimento porta a cambiamenti degenerativi, simili a quelli dell'osteoartrosi. Il condrocito ha bisogno, infatti, di

continui stimoli meccanici per produrre proteoglicani, stimoli non solo legati al movimento ma anche all'applicazione di carichi compressivi graduati.

Ecco perché, specialmente dopo lunghi periodi d'inattività o dopo la rimozione di un apparecchio gessato, è indispensabile applicare un carico ottimale per ottenere un'ideale consolidazione ossea e iniziare senza rischi la fase seguente di riabilitazione. Nelle lesioni degenerative, la cartilagine perde le caratteristiche biologiche: diventa meno elastica e va incontro a progressiva degenerazione strutturale. La prima manifestazione di sofferenza cartilaginea è un semplice "**rammollimento**" della stessa, seguito da un'iniziale interruzione della continuità del piano cartilagineo e poi da irregolarità sempre più importanti della superficie articolare, fino alla formazione di una vera e propria artrosi.

La degenerazione della cartilagine può essere determinata da fattori meccanici o biologici. Tra i primi:

- alterazioni posturali e conseguenti non corretto allineamento delle superfici articolari
- Alterato asse di movimento
- Pregresse rotture o degenerazioni di strutture complementari (menischi, legamenti ...)
- Pregresse fratture coinvolgenti la superficie articolare

Le lesioni possono localizzarsi in una sola sede (rotula, femore, piatto tibiale etc.) e sono definite **monofocali**, oppure possono essere **plurifocali**. Le lesioni della cartilagine articolare determinano l'alterazione dell'integrità anatomica e funzionale del tessuto, situazione negativa soprattutto negli atleti.

Questo giustifica la continua ricerca di metodi tendenti a ripristinare una condizione funzionale o quantomeno a ritardare la degenerazione cartilaginea. L'insorgenza dell'osteoartrosi non è altro che il fallimento dei condrociti nel mantenere l'omeostasi tra la sintesi e la degradazione dei componenti extracellulari della matrice.¹⁶ L'interruzione dell'omeostasi aumenta il

contenuto in acqua e diminuisce il contenuto di proteoglicani nella matrice extracellulare, questo porta ad un indebolimento della struttura collagene, a causa di una diminuzione nella sintesi del collagene tipo II, e aumenta la distruzione del collagene preesistente. Inoltre vi è un aumento di apoptosi nel pool condrocitario. All'inizio di questo processo vi è un meccanismo di compensazione, che aumenta la sintesi delle molecole della matrice e la proliferazione dei condrociti negli strati più profondi della cartilagine, riuscendo a mantenere l'integrità della cartilagine articolare. Non appena la perdita di condrociti diviene più consistente, i cambiamenti all'interno della matrice aumentano e inizia il processo artrosico.

CARTILAGINE E INVECCHIAMENTO

Dal momento che le cellule condrocitarie dell'adulto hanno una limitata o assente capacità di replicazione, le lesioni che interessano questo tessuto vengono ad accumularsi, determinando cambiamenti correlati all'età del paziente.¹⁷ Come conseguenza l'invecchiamento altera profondamente la funzione dei condrociti, la struttura e il funzionamento della matrice cellulare. (Tabella 1).

Cambiamenti con l'invecchiamento	Contributo all'osteoartrosi
Accumulo di cellule che esibiscono il fenotipo di secrezione delle cellule in degenerazione	Incremento della produzione di citochine e di MMP che stimola la degradazione della matrice
Danni da stress Ossidativo	Incremento della suscettibilità alla morte cellulare e riduzione della sintesi della matrice
Diminuzione dei livelli di fattori di crescita e diminuzione alla responsività ai fattori di crescita	Ridotta sintesi e riparazione della matrice
Aumento di cellule invecchiate	Tessuto più fragile più sensibile alla rottura per sovraccarico
Accumulo di cellule che esprimono il fenotipo secretorio senescente	Aumento delle citochine e produzione di metalloproteinasi che stimolano la degradazione della matrice extracellulare

Tab.1 Modifiche alla cartilagine indotte dall'invecchiamento e loro correlazione con l'osteoartrosi

Sembra essere evidente una riduzione del numero dei condrociti correlata all'invecchiamento tissutale della cartilagine.¹⁸ Sono ancora pochi gli studi che descrivono l'aumento dell'apoptosi collegata all'invecchiamento.¹⁹ Un accorciamento dei telomeri è un aspetto ricorrente nelle cellule invecchiate. Sebbene il turnover cellulare sia lento, sembra che questo cambiamento necessiti almeno di 30 cicli replicativi. L'accorciamento dei telomeri può essere anche indotto dallo stress, un meccanismo simile a quello che avviene

nell'infiammazione cronica e nello stress ossidativo.²⁰ L'aumento dell'età cellulare si esprime in un'alterazione fenotipica delle cellule, definita fenotipo secretorio senescente.²¹ Questo fenotipo è caratterizzato dall'aumento di produzione di citochine e di fattori di crescita. L'accumulo di cellule che esprimono questo fenotipo può contribuire all'invecchiamento tissutale, stimolando la degradazione della matrice e riducendone la sintesi.²² I condrociti diventano meno sensibili ai fattori di crescita con l'invecchiamento e nel contempo si assiste a una riduzione dei meccanismi di riparazione. Una diminuita risposta all'Insulin-like growth factor-I (IGF-1), dovuto a un'alterazione del segnale può contribuire alla morte cellulare. I cambiamenti di dimensione, struttura e solfatazione dell'agrecano nelle molecole della matrice, comportano cambiamenti nelle proprietà biofisiche della matrice cartilaginea, riducendo l'elasticità e la resistenza meccanica.^{23,24,25}

La cartilagine articolare ha un turnover relativamente lento e per questo è più suscettibile all'accumulo dei prodotti della glicazione avanzata (A.G.E.: Advanced Glycation End products), derivante dalla glicazione non enzimatica spontanea delle proteine.²⁶ L'aumento del collagene cross-linkato a causa di modifiche dovute alla formazione di complessi AGE rende la cartilagine più fragile e soggetta a rottura per sovraccarichi meccanici, questa alterazione sembra avere un ruolo determinante nell'osteoartrosi.^{27, 28}

C'è sempre maggior evidenza che lo stress ossidativo con la produzione di radicali liberi sia coinvolto nei processi di invecchiamento e nell'insorgenza dell'osteoartrosi.²⁹ L'aumento dei livelli di radicali liberi può interagire con il DNA cellulare e con il DNA mitocondriale³⁰, influenzando sulla omeostasi del condrocito, danneggiandone la vitalità cellulare e contribuendo all'espressione del fenotipo secretorio senescente³¹, e riducendo la sensibilità al IGF-1.³²

TRATTAMENTO DELLE LESIONI OSTEOCONDRALE

Le tecniche più utilizzate sono:

1. Shaving cartilagine
2. Abrasione artroplastica
3. Microfratture
4. Mosaicoplastica
5. Trapianto di Condrociti Autologhi
6. Ricostruzione mediante scaffold tridimensionali

Le prime tre metodiche, pur presentando buoni risultati, permettono solo di ottenere la formazione di un neo tessuto fibrocartilagineo con proprietà morfologiche e strutturali molto diverse da quelle che identificano la cartilagine ialina della superficie articolare: si ottiene in definitiva solo un rallentamento del processo artrosico.

La mosaicoplastica utilizzata da tempo con buoni risultati, ha lo svantaggio di dover utilizzare cartilagine sana prelevata da una zona sana del corpo del paziente. Esiste quindi un limite fisico al prelievo di cartilagine, che limita l'impiego di questa tecnica a lesioni di dimensioni di piccolo media entità.

Di miglior efficacia, anche se in forte evoluzione, è la metodica con trapianto autologo di condrociti che attualmente rappresenta la migliore soluzione, soprattutto per il trattamento dei gravi difetti cartilaginei negli sportivi e negli adolescenti. Tale tecnica è stata descritta per la prima volta sul New England Journal of Medicine da alcuni medici svedesi, fra i quali L. Peterson e M. Brittberg ed ha suscitato grande curiosità e interesse in ambito ortopedico.³³

Da allora sono stati sviluppati numerosi scaffold per la coltura cellulare e l'impianto, che hanno permesso di impiantare i condrociti anche mediante tecnica artroscopica.

Questa tecnica utilizza una soluzione "biologica" per rigenerare la cartilagine ialina degenerata. Aspetto decisivo per la buona riuscita di questa metodica è la vitalità e la densità delle cellule condrocitarie autologhe dedifferenziate che sono trasferite nel difetto da riparare.

Il trapianto di condrociti autologhi prevedeva che l'impianto autologo di condrociti fosse mantenuto in sede da un lembo periostale prelevato dallo stesso paziente; attualmente sono state aggiunte varianti che permettono una migliore distribuzione delle cellule impiantate nel difetto condrale.

La procedura chirurgica prevede due tempi: il primo si esegue in artroscopia, durante la quale si valuta l'entità del danno condrale decidendo se effettuare il trattamento con trapianto condrocitario; se si decide per tale trattamento, si procede prelevando un frammento di cartilagine sana da coltivare in vitro in laboratorio. Dopo circa 3-4 settimane la coltura è pronta per il trapianto, che sarà compiuto entro quarantotto ore dal ricevimento del tessuto cartilagineo da impiantare.

Rispettare le indicazioni previste per questo tipo di trattamento, rappresenta il punto chiave per una buona riuscita di questa tecnica. Il ricorso a tali metodiche viene stabilito tenendo conto della situazione clinica del paziente e di rigorosi requisiti di inclusione e di esclusione.

In letteratura sono presenti numerose classificazioni (Outerbridge, Bauer, Noyes, ICRS eccetera) che però non sempre riescono a definire correttamente il tipo di lesione cartilaginea. Il ricorso alla risonanza magnetica (RM) spesso non chiarisce il quesito.

La Società Internazionale per la riparazione della cartilagine (International Cartilage Repair Society, ICRS), prevede criteri assoluti che sono riportati in Tabella 2.

L'introduzione degli scaffold ha lo scopo di dare ai condrociti la possibilità di usufruire di una struttura tridimensionale da colonizzare, facilitando la sintesi della matrice extracellulare, e fornendo le proprietà biomeccaniche necessarie alla sopravvivenza delle cellule fino a quando il difetto osteocondrale non sia

riparato.³⁴ Per adempiere a questa funzione lo scaffold deve avere queste caratteristiche:

1. Essere biodegradabile
2. Avere una porosità che permette la diffusione di nutrienti e l'eliminazione dei prodotti di scarto
3. Supportare la migrazione cellulare, la loro proliferazione, la differenziazione e la produzione di matrice extracellulare
4. Essere in grado di integrarsi nel sito di lesione
5. Dare un supporto meccanico

Molti materiali sintetici e naturali sono stati usati a questo scopo e solo negli ultimi anni si sono trovati degli scaffold tridimensionali complessi, che sembrano dare risultati soddisfacenti nel trattamento di lesioni osteocondrali di grandi dimensioni.^{35,36}

CRITERI DI IDONEITÀ AL TRATTAMENTO DELLE LESIONI CARTILAGINEE MEDIANTE IMPIANTO DI CONDROCITI AUTOLOGHI
--

<p>Presenza di difetti condrali di maggiori dimensioni (oltre 1,5 cm²) di grado IV e, in alcuni casi di grado III in pazienti sintomatici; lesioni condrali analoghe in pazienti asintomatici in corso di chirurgia ricostruttiva legamentosa, di trapianto meniscale o di osteotomia di normocorrezione tibiale</p>

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Lesioni preferibilmente a carico dei condili femorali - Età compresa fra i 16 e i 45-50 anni - Eziologia traumatica e osteocondrite dissecante - Integrità dei menischi - Correzione chirurgica delle instabilità legamentose e delle deviazioni assiali - Pazienti sintomatici con precedenti fallimenti di trattamenti chirurgici cartilaginei - Esclusione di pazienti in soprappeso - Esclusione di pazienti artrosici. Le localizzazioni articolari plurime vanno valutate caso per caso: tre o più localizzazioni nella stessa articolazione sono da considerarsi quadri artrosici - Esclusione di pazienti con malattie metaboliche, sistemiche, infettive e reumatiche |
|--|

Tab.2 Indicazioni al trattamento chirurgico delle lesioni osteocondrali

PLASMA RICH PLATELETS

In Europa e più recentemente negli Stati Uniti, si è diffuso negli ultimi anni l'utilizzo di derivati del sangue autologo per facilitare la guarigione in molteplici campi. La ricerca scientifica ha fornito nuovi elementi per comprendere i meccanismi di guarigione delle ferite e delle lesioni muscolo-scheletriche e articolari.

Inizialmente si pensava che le piastrine funzionassero solo se inserite nel contesto del coagulo. In seguito si è capito che le piastrine stesse possono rilasciare molte citochine in grado di richiamare macrofagi, cellule mesenchimali e osteoblasti che non solo promuovono la rimozione del tessuto necrotico, ma aumenta la rigenerazione tissutale e la guarigione.

Le piastrine stimolano la liberazione di fattori di crescita anche nei processi patologici cronici. Sebbene la letteratura non riporti studi randomizzati con grandi casistiche per ora, ma si basi su casistiche piccole con livello di evidenza basso, si stanno formando gruppi multicentrici con protocolli ben definiti per l'utilizzo del Plasma Rich Platelets nei più svariati campi.^{37,38}

In accordo con i dati forniti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) le lesioni muscolari sono le più comuni cause di dolore severo, e inabilità al lavoro e affligge ogni giorno milioni di persone in tutto il mondo. Infatti, la decade 2000-2010 è stata dedicata alle patologie che interessano il sistema muscolo-scheletrico (the decade of bone and joint), come iniziativa globale per promuovere la prevenzione e la ricerca sulla diagnosi e il trattamento.^{39,40}

Le lesioni dei tessuti molli comprendenti la cartilagine articolare, i tendini e i legamenti rappresentano il 45% di tutte le lesioni del sistema muscolo-scheletrico negli stati uniti.^{1,41}

La crescente popolarità delle attività sportive, ha portato ad un incremento

nell'epidemiologia dei traumi articolari. In aggiunta a questo le moderne tecniche d'imaging ed in particolare la risonanza magnetica, hanno dato la possibilità di approfondire ulteriormente le caratteristiche di queste lesioni.

COMPONENTI DEL SANGUE

Il sangue contiene una parte liquida il plasma e una parte cellulata formata da globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. Il plasma contiene principalmente acqua e funge da trasportatore per le cellule, contiene fibrinogeno una proteina che agisce come una rete che imbriglia le piastrine nel sito di lesione per formare il coagulo.

Le piastrine sono deputate all'emostasi, alla costruzione di nuovo tessuto connettivo e alla rivascolarizzazione. Tipicamente in una provetta di sangue intero ci sono il 93% dei globuli rossi, il 6% di piastrine e 1% di globuli bianchi. Il rationale del PRP è quello di modificare queste percentuali portando i globuli rossi al 5%, poiché sono meno influenti nel processo di guarigione, e portando il numero delle piastrine al 94%.⁴²

PIASTRINE

Le piastrine sono piccole cellule discoidi prodotte nel midollo osseo con una vita di circa 7-10 giorni. Dentro alle piastrine vi sono molte strutture intracellulari contenenti glicogeno, lisosomi e 2 tipi di granuli. I granuli alfa contengono i fattori di crescita e i fattori coagulanti che vengono rilasciati durante i processi di guarigione.

Normalmente in fase di riposo, le piastrine richiedono un segnale per diventare attive e partecipare ai processi riparativi.⁴³

Dopo l'attivazione attraverso la trombina, le piastrine cambiano la loro forma, e sviluppano delle propaggini, chiamate pseudopodi fondamentali per il

meccanismo di aggregazione. I granuli contenuti all'interno delle piastrine inoltre rilasciano fattori di crescita e citochine che stimolano la cascata infiammatoria e il processo di guarigione.⁴⁴

PRP

Il Platelet Rich Plasma è definito come un volume di plasma la cui concentrazione di piastrine sia superiore a quella fisiologica.^{45,46} La normale concentrazione di piastrine è 200.000/ml, alcuni studi hanno dimostrato che per mostrare l'efficacia clinica la concentrazione deve essere superiore ad 1.000.000 di piastrine/ml. Non sono stati effettuati studi su eventuali effetti paradossi dovute a concentrazioni troppo elevate di PRP.

L'utilizzo di Plasma Rich Platelets è stato introdotto per primo da Ferrari⁴⁷ nel 1987 per diminuire le perdite ematiche, e le trasfusioni, in interventi di cardiocirurgia.

Da quel tempo l'applicazione di PRP autologo è stata usata e in molti campi, quali l'ortopedia, la medicina sportiva, l'odontoiatria, la neurochirurgia, l'oftalmologia, l'urologia, la cardiocirurgia, la chirurgia maxillofaciale e la chirurgia plastica. Inoltre è stata impiegata per la cura delle ferite complesse e delle ulcere.

I più recenti studi suggeriscono che il PRP può influire positivamente sui processi infiammatori tissutali, sulla perdita ematica postoperatoria, sulle infezioni e sull'osteogenesi. In aggiunta al ruolo principale nell'emostasi locale in caso di lesione vascolare, le piastrine contengono una grande quantità di fattori di crescita e citochine di fondamentale importanza nella guarigione dei tessuti molli e della guarigione ossea.⁴⁰

Studi più approfonditi hanno permesso di capire meglio il ruolo delle piastrine nel processo di guarigione e ha portato allo sviluppo di nuove applicazioni terapeutiche.

FATTORI DI CRESCITA

Werner ha spiegato il ruolo centrale dei fattori di crescita e delle citochine nei processi di rigenerazione tissutale.⁴⁸ Tuttavia in letteratura si trovano pareri contrastanti sui potenziali benefici dell'utilizzo di questi fattori. In particolare alcuni autori riportano buoni risultati sull'impiego del PRP nella formazione ossea e sulla riparazione tissutale, mentre altri descrivono una non sostanziale differenza rispetto al processo di guarigione fisiologico.^{49,50}

Questa differenza nei risultati è principalmente da attribuire alla necessità di una standardizzazione nei protocolli di preparazione e di somministrazione del PRP. Sono presenti in commercio diversi sistemi di preparazione del PRP, differenti centrifughe e attivatori, inoltre la percentuale di leucociti presenti può interferire con i risultati finali.

Gli alfa granuli sono dell'unità di stoccaggio contenute all'interno delle piastrine, che contengono fattori di crescita inattivati. (Fig. 6)

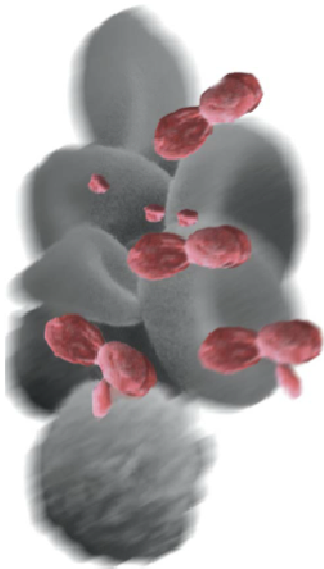


Fig. 6 Piastrina non attiva

I principali fattori di crescita contenuti in questi granuli sono: transforming growth factor beta (TGFbeta), vascular endothelial growth factor (VEGF) platelet-derived growth factor (PDGF), and epithelial growth factor (EGF) (Tab. 3).⁵¹

Fattori di crescita	Azione sul tessuto cartilagineo
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Stimola la replicazione cellulare Promuove l'angiogenesi Promuove l'epitelizzazione Promuove la formazione di tessuto di granulazione
Transforming growth factor (TGF)	Promuove la formazione di matrice extracellulare Regola il metabolismo delle cellule ossee
Vascular endothelial growth factor (VEGF)r	Promuove l'angiogenesi
Epidermal growth factor (EGF)	Promuove la differenziazione cellulare Stimola la riepitelizzazione Stimola l'angiogenesi Stimola la produzione di collagene
Fibroblast growth factor (FGF)	Promuove la proliferazione di cellule endoteliali e dei fibroblasti Stimola l'angiogenesi

Tab. 3 Elenco dei principali fattori di crescita contenuti all'interno del PRP

I granuli contengono anche vitronectina, una molecola che favorisce l'adesione

tra le cellule e incrementa l'osteointegrazione e l'osteoconduzione.

Il TGFbeta è attivo durante l'infiammazione e influenza la regolazione della migrazione e della proliferazione cellulare; stimola la replicazione cellulare.

VEGF è prodotto ai più alti livelli solo dopo la fase infiammatoria ed è un potente stimolante dell'angiogenesi.

PDGF stimola la produzione degli altri fattori di crescita e ha un ruolo importante nel rimodellamento tissutale.

PDGF promuove la replicazione delle cellule mesenchimali, la produzione ossea, la replicazione delle cellule endoteliali e la sintesi di collagene. E' il primo fattore di crescita che viene liberato all'interno della ferita, e inizia il processo di guarigione promuovendo la sintesi di collagene e proteine.⁵² Tuttavia recenti studi hanno suggerito che può essere anche coinvolto nell'inibizione della crescita ossea.⁵³

Studi in vitro e in vivo hanno dimostrato come il bFGF sia un potente stimolatore dell'angiogenesi, che un regolatore della migrazione cellulare e della proliferazione.

IGF-I viene espresso nelle prime fasi dell'infiammazione e assiste la migrazione e proliferazione dei fibroblasti nei tendini e aumenta la produzione di collagene.⁵⁴

Sebbene, in laboratorio il PRP umano abbia dimostrato un incremento delle concentrazioni di PDGF, TGFbeta, VEGF ed EGF, non dimostrando influenze sul IGF-1.⁵¹

Gli effetti dell'EGF sono limitati alle cellule dello strato basale della cute e alle membrane mucose inducendo la migrazione e la proliferazione cellulare.

SICUREZZA NELL'UTILIZZO DEL PRP

Tutti gli aspetti legati a reazioni immunologiche e alla trasmissione di malattie infettive sono state eliminate, dal momento che il PRP è preparato da sangue autologo. Nessuno studio ha documentato una correlazione con iperplasie, carcinogenesi o crescita tumorale. I fattori di crescita agiscono sulle membrane cellulari più che sul nucleo cellulare e attivano una normale espressione genica.⁵²

I fattori di crescita, infatti, non sono mutageni e agiscono mediante la regolazione genica e il normale meccanismo di riparazione tissutale attraverso un meccanismo di controllo a feed-back.⁴²

Controindicazioni relative possono essere la presenza di tumori, metastasi, infezioni attive o valori alterati di contrazione piastrinica all'interno del sangue da prelevare. Considerate come controindicazioni sono la gravidanza e l'allattamento.

Il paziente deve essere informato che è possibile un temporaneo peggioramento della sintomatologia dopo la terapia, questo accade per una stimolazione dei mediatori della naturale risposta infiammatoria.

L'insorgenza di complicanze è rara, tuttavia come in tutte le iniezioni c'è un rischio minimo d'infezione, di lesione neurovascolare, di formazione di tessuto cicatriziale e di calcificazioni nella zona vicino al sito d'iniezione.

Sono riportate anche reazioni allergiche alla lidocaina o ad altri anestetici locali. In più quando utilizzato per iniezioni intra articolari o addizionato in tecniche chirurgiche a cielo aperto, può essere aggiunto calcio cloridrato o trombina bovina per formare una matrice di gel. Questa trombina bovina usata per attivare il PRP, in passato è stata considerata la causa dell'insorgenza di coagulopatie correlate alla formazione di anticorpi contro il Fattore V, XI, e trombina.⁵⁵ Dal 1997 questo problema è stato risolto eliminando la contaminazione da parte di questa trombina e utilizzando il Fattore Va.

SCELTA DEL TIPO DI STUDIO ANIMALE

La cartilagine articolare ha una capacità di rigenerazione molto limitata. Conseguentemente lesioni degenerative e traumatiche portano a un'inevitabile accelerazione dei processi artrosici. Si è stimato che i costi per questa patologia negli Stati Uniti ogni anno siano circa 60 miliardi di dollari.⁵⁶ L'impatto socio-economico di questa patologia ha motivato clinici e ricercatori a trovare nuove strategie per aumentare la riparazione e la rigenerazione della cartilagine articolare. Oltre ai traumi i fattori correlati con la degenerazione cartilaginea sono l'età avanzata, l'obesità, il sesso femminile.⁵⁷ I metodi per creare una lesione della cartilagine e la successiva degenerazione artrosica in un modello animale sono essenzialmente 3:

1. lesione diretta^{58,59}
2. degenerazione progressiva inducendo la instabilità articolare⁶⁰
3. uso di agenti condrotossici⁶¹

I difetti condrali nell'uomo si possono riscontrare nel ginocchio sintomatico, nell'anca e nella caviglia, in ordine decrescente di frequenza. Visto l'aumento di queste patologie, influenzato dall'aumento dei partecipanti ad attività sportive e all'aumento dell'età nella popolazione americana ed europea, si sta assistendo ad un rinnovato interesse alla comprensione dei meccanismi patogenetici e alla cura dei difetti condrali focali. Queste ricerche includono lo sviluppo di metodiche per il trapianto di condrociti autologhi e lo sviluppo di scaffold tridimensionali. Per introdurre queste metodiche nella pratica clinica, non è possibile utilizzare solo esperimenti in vitro, ma è essenziale testarle in vivo su animali.⁶² Tuttavia la scelta del tipo di animale su cui eseguire lo studio presenta vantaggi e svantaggi. Gli animali più comunemente usati per questo tipo di studi sono cavia, ratti, conigli, cani, ovini, maiali e cavalli. Le caratteristiche

principali di cui tener conto per gli studi sono l'ampiezza della superficie e lo spessore cartilagineo. (Fig. 7)



Fig. 7 Superficie articolare del femore distale differenze in dimensioni tra ratto, pecora e uomo.

La cartilagine umana tuttavia si discosta per spessore ed ampiezza della superficie da quelle animali, ne consegue che il tipo di animale deve essere scelto a seconda delle possibilità economiche e del tipo di studio da effettuare.

CAVIE



Le cavia offrono grandi vantaggi in termini di riproducibilità, per l'esistenza di ceppi selezionati transgenici, in cui le differenze tra esemplari sono fortemente ridotte, se paragonata agli altri animali. Il loro mantenimento è molto semplice

ed economico. La possibilità di avere anche ceppi immunocompromessi permette studi con pool, cellulari e tessuti allogenici e xenogenici.

Il più grande svantaggio è dovuto alle ridotte superfici articolare e al piccolo spessore della cartilagine formata da 2 o 3 strati cellulari. (Fig. 8) D'altra parte come già sottolineato la possibilità di avere cavie con basse risposte immunitarie ha permesso anche lo sviluppo dei primi studi sulla rigenerazione cartilaginea.

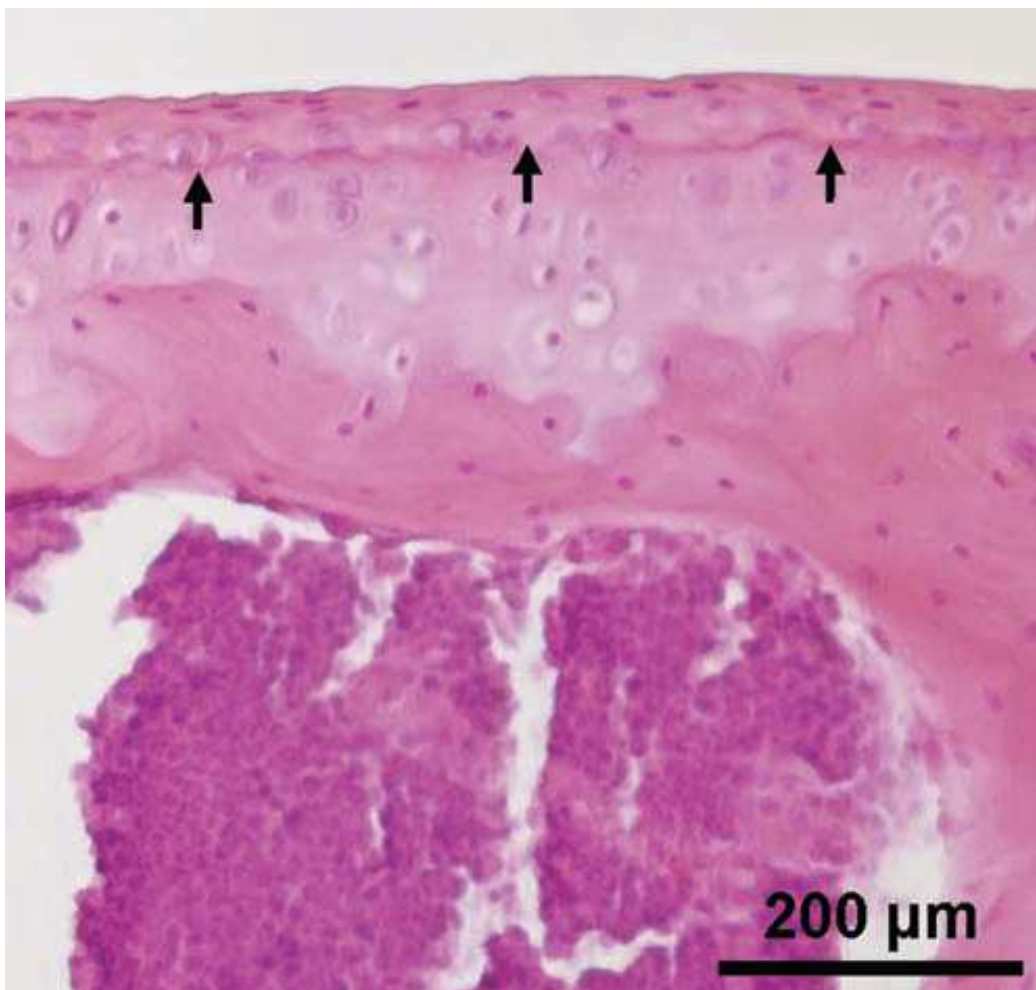


Fig. 8 Aspetto istologico della cartilagine articolare di una cavia (femore distale), che evidenzia l'estrema sottigliezza dello strato cartilagineo, al di sopra delle frecce, formato da solo 2 o 3 strati di cellule.

In particolare Vacanti et al. hanno dimostrato la possibilità di generare cartilagine ialina seminando con condrociti umani materiale biodegradabile

utilizzato per le suture, sul dorso di cavie atimiche, dando inizio all'ingegneria tissutale per la ricostruzione della cartilagine.⁶³ In aggiunta a questo vi è la possibilità di selezionare cavie in cui l'artrosi insorge spontaneamente, e alcuni studi si stanno orientando verso la terapia genica per la riparazione della cartilagine e la sua rigenerazione.^{64,65,66}

Per esempio nei Jackson Laboratories di Bar Harbor (Maine, Stati Uniti) hanno evidenziato che in cavie selezionate MRL/MpJ, la cartilagine ripari meglio che nelle altre cavie. Questo è stato correlato con la diminuzione delle citochine proinfiammatorie come l'interleuchina 1 e con aumentati livelli di citochine antiinfiammatorie.⁶⁷ Sebbene cavie transgeniche possano essere difficili da mantenere e riprodurre, l'uso di questi modelli può portare informazioni importanti per la comprensione dei meccanismi di riparazione della cartilagine. La comprensione delle basi molecolari della rigenerazione condrale può generare nuove opzioni terapeutiche, da approfondire con studi preclinici in animali di maggiori dimensioni.

RATTI



Gli studi eseguiti con i ratti hanno i vantaggi economici delle cavie, uniti alle maggiori dimensioni che incrementano la flessibilità e la riproducibilità degli studi in cui vengono eseguite lesioni osteocondrali.⁶⁸ I protocolli che utilizzano i ratti sono economici e possono essere impiegati come studi preliminari per nuovi scaffold biodegradabili e polimeri. Ferretti et al. ad esempio utilizzando un modello di difetto osteocondrale nel ratto, ha studiato la degradazione dello

scaffold biodegradabile PEG-genipin biocompatibile all'interno della lesione osteocondrale della troclea femorale indotta (Fig.9).⁶⁹ Gli scaffold negli ultimi anni si sono imposti come elementi cardine nella strategia riparativa per lesioni osteocondrali focali,⁷⁰ in quanto forniscono un supporto tridimensionale per la crescita tissutale e il rilascio di agenti condrogenici.

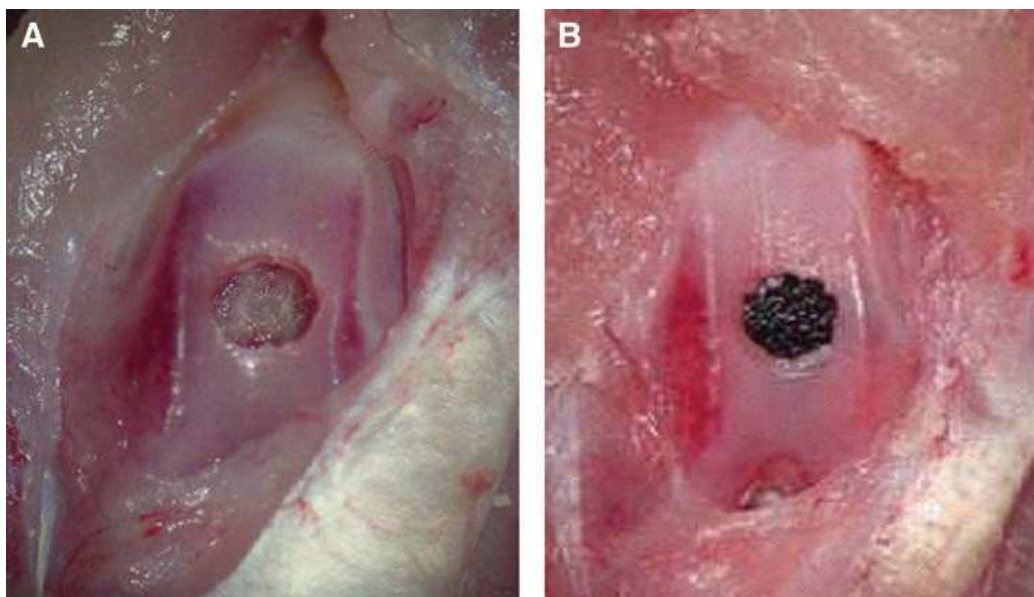


Fig. 9 A) Lesione osteocondrale trocleare di 1,5 mm in un ratto. B) Il difetto viene riempito con scaffold PEG-genipin.

Sebbene di dimensioni superiori alle cavie, gli studi con ratti soffrono delle stesse limitazioni, dovute alla superficie articolare ridotta, al minimo spessore della cartilagine e alla rigenerazione tissutale intrinseca, dovuta al fatto che le cartilagini di accrescimento nei roditori rimangono aperte durante tutta la vita.⁷¹ La cartilagine più sottile è più facile da danneggiare ma anche più facile da riparare rispetto a quella dell'uomo. Watrin-Pinzano et al hanno valutato mediante risonanza magnetica la riparazione cartilaginea spontanea dopo una lesione indotta nella rotula di un ratto.⁷² Al di là di tutte queste considerazioni i roditori rimangono modelli molto utili per la ricerca, per i bassi costi, per la

possibilità di avere ceppi transgenici e immunodepressi, e per la facilità di gestione. Inoltre è possibile ottenere studi che comprendono grandi numeri di soggetti utili per studi preliminari.

CONIGLI



Gli studi eseguiti su conigli in questo campo sono stati numerosi, per la facilità d'impiego e i costi accessibili. Come in altri modelli con animali di piccola taglia, i conigli offrono la possibilità di lavorare con molti soggetti genotipicamente simili.^{73,74,75}

Nei primi anni della ricerca sull'ingegneria tissutale, gli studi con i conigli divennero molto popolari, per via dell'utilizzo dei condili femorali dei conigli bianchi Neozelandesi che erano abbastanza grandi da poter permettere la riparazione tissutale dopo una lesione osteocondrale di circa 3-4 mm. Questa dimensione era considerata accettabile per permettere di capire se i nuovi impianti fossero in grado di integrarsi.

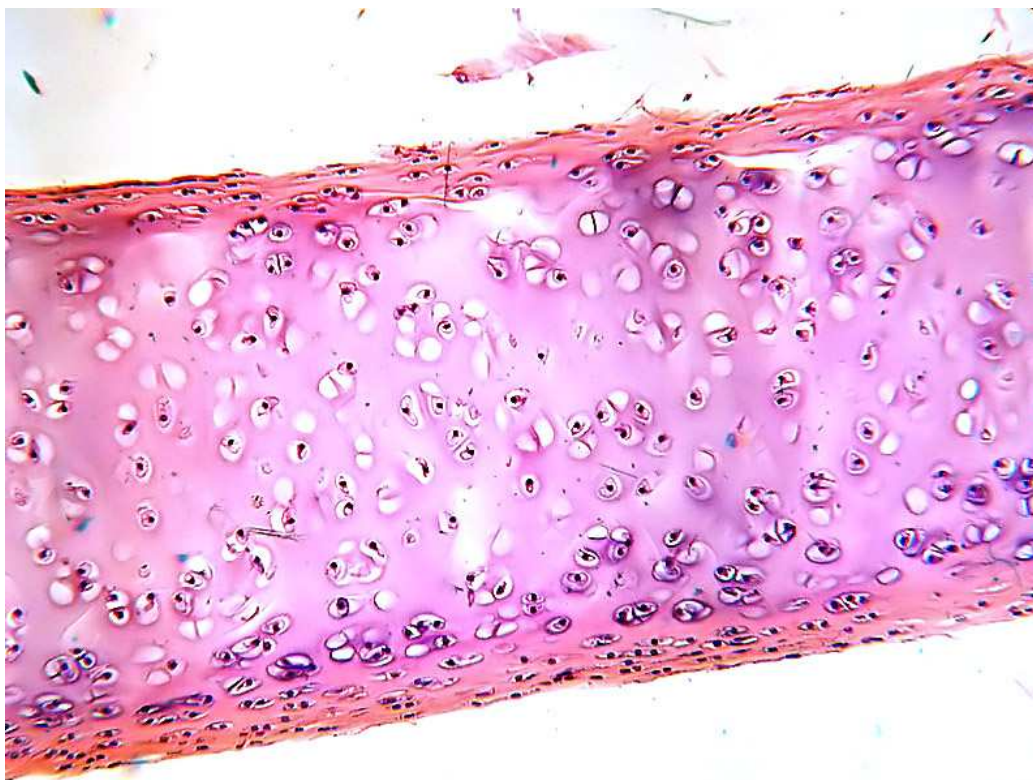


Fig. 10 Cartilagine articolare di coniglio sezione trasversale

In seguito si svilupparono studi che descrivevano le caratteristiche di riparazione cartilaginea intrinseca del coniglio.⁷⁶ Shapiro et al. usarono 122 soggetti per documentare l'origine della riparazione a tutto spessore di queste lesioni osteocondrali, concludendo che questa originava interamente dalla proliferazione e differenziazione di cellule mesenchimali derivate dal midollo osseo, senza partecipazione di altre cellule derivate dalla residua cartilagine articolare adiacente.⁷⁷ Nell'uomo invece se presente una lesione osteocondrale non va incontro a riparazione spontanea, e questo evidenziò come i risultati di questi studi fossero difficilmente applicabili a studi clinici sull'uomo. Inoltre anche nel coniglio la cartilagine risulta essere molto sottile, un'analisi elaborata ha evidenziato come lo spessore medio della cartilagine sia di 0,44 mm. nella troclea femorale e di 0,3 mm. nel condilo antero mediale.⁷⁸ (Fig. 11)

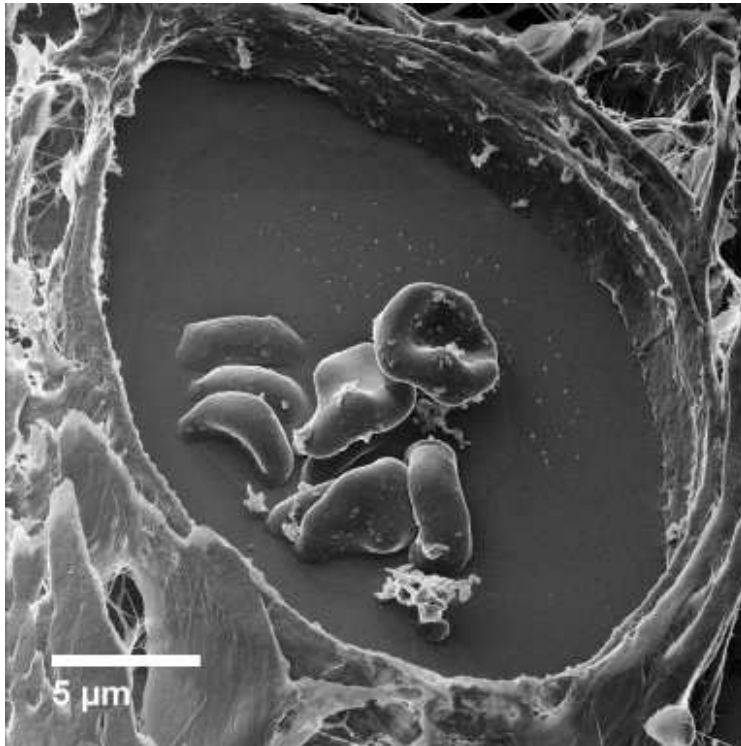


Fig. 11 Immagine al microscopio elettronico di una zona profonda della cartilagine articolare di coniglio. Nella porzione centrale è possibile apprezzare la sezione di un vaso.

Questo limita la dimensione e la profondità della lesione cartilaginea da riprodurre. In effetti il valore della profondità più comunemente riportato in letteratura è pari a 3 mm.^{79,80} Il che significa che più dell'80% della lesione è situato nell'osso subcondrale. In aggiunta a queste considerazioni, il coniglio ha differenti condizioni di carico, dovute all'alto range di flessione del ginocchio. I conigli infatti utilizzano la troclea femorale come una superficie di carico parziale, che, aggiunto al loro peso leggero (2-5 Kg.) crea enormi differenze di carico se paragonati ad animali di taglia più grande e all'uomo.⁸¹ In conclusione anche il coniglio sembra rappresentare un modello pratico per i primi stadi di valutazione di una terapia, per i bassi costi, la facile gestione e la dimensione dell'articolazione per le pratiche chirurgiche. Tuttavia questo modello ha perso i favori dei ricercatori in quanto i risultati ottenuti sono influenzati dall'alto potenziale di rigenerazione spontanea, dalle differenze nel carico articolare e dal ridotto spessore della cartilagine.

PECORE



Il modello animale più utilizzato per la ricerca sulla cartilagine è la pecora assieme alla capra.^{82,83}

Questo modello offre vantaggi quali, la dimensione articolare, lo spessore della cartilagine e la possibilità di eseguire procedure anche in artroscopia, inoltre ha una limitata capacità di guarigione spontanea.

L'articolazione della pecora è più grande di quella del cane ed è possibile effettuare lesioni superiori a 6 mm, dimensione considerata non capace di guarigione spontanea.^{84,85}

La proporzione tra spessore della cartilagine e osso subcondrale e la consistenza dell'osso subcondrale è più simile a quella umana, se paragonata a quello di altri animali. La pecora inoltre è più semplice da gestire e relativamente economica. In questo modello animale è più difficile limitare il carico o applicare protocolli di terapia fisica. La pecora inoltre è stata utilizzata per la valutazione preclinica di molti nuovi impianti. In particolare Niederauer et al. hanno trattato lesioni osteocondrali con vari dispositivi impiantabili ottenendo la riparazione con cartilagine ialino-simile e con buon ripristino dell'osso subcondrale.⁸⁶

I ricercatori sono riusciti ad impiantare anche cellule mesenchimali autologhe (BMCs) precedentemente aspirate dalla cresta iliaca.⁸⁷ D'altro canto è più difficile la preparazione di fibrina autologa, comunemente utilizzata negli studi con equini. Nella valutazione delle lesioni condrali, questo modello permette di studiare la riparazione di lesioni parziali o a tutto spessore, infatti lo spessore del condilo femorale mediale varia da 0,8 a 2,0 mm.⁸⁸ In aggiunta la dimensione

articolare permette di creare lesioni simili a quelle di piccole dimensioni, ma già clinicamente rilevanti, osservate nell'uomo.

Tra gli aspetti da considerare nella scelta del modello vi è quello della variazione della concentrazione delle piastrine, all'interno delle varie specie. E' importante conoscere i valori fisiologici della concentrazione piastrinica in ogni singolo animale per non variare la concentrazione finale del PRP impiegato. (Tab. 4)

SPECIE	PIASTRINE/ml
Uomo	150.000-400.000
Bovino	100.000-800.000
Cavallo	100.000-350.000
Pecora	250.000-750.000
Capra	300.000-600.000
Suino	100.000-900.000

Tab.4 Valori fisiologici della concentrazione piastrinica nelle varie specie animali.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati 10 conigli della stessa età e di taglia simile ($3 \pm 0,4$ kg) di sesso femminile. Il comitato etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli ha approvato le procedure utilizzate in questo studio.

PREPARAZIONE DEL PRP

Il PRP è stato ottenuto, da ciascun coniglio eseguendo un prelievo, 1 ora prima dell'intervento, di circa 20ml di sangue venoso addizionato con ACD-A, una soluzione di citrato di sodio, acido citrico e destrosio. L'ACD-A è un anticoagulante utilizzato normalmente nella pratica dei prelievi e delle trasfusioni. Il citrato ha un'azione chelante per il calcio presente nel campione di sangue prelevato, legando l'atomo di calcio a tenaglia. Il destrosio serve alla conservazione delle piastrine e dei globuli. Questa soluzione conservata a 4° è stata poi sottoposta a 2 processi di centrifuga (Fig.12): il primo dei quali (15 minuti a 800 rpm) per separare il plasma dai globuli, mentre il secondo (15 minuti a 2000 rpm) per la concentrazione delle piastrine. Il PRP così ottenuto è stato conservato a -80° fino al giorno dell'infiltrazione.



Fig. 12 Centrifuga, Heraeus Centrifuge Biofuge 28RS, utilizzata per la concentrazione del PRP nel nostro studio

PROTOCOLLO UTILIZZATO

- Prelievo 20 ml sangue
- 1° Centrifugazione a 800 r.p.m. per 15 min.
- 2° Centrifugazione a 2000 r.p.m. per 15 min.
- Conta numero piastrine ($\% = \frac{n. \text{ nel PRP}}{n. \text{ plasma}} \times 100$)
- Attivazione piastrinica 50 μ l/ml di Citrato di Calcio
- Aliquote di plasma e PRP a -80°C per dosaggio di:
- Transforming Growth Factor β 1 (*TGF- β 1*)
- Platelet Derived Growth Factor AB (*PDGF AB*)
- Interleuchina 1 (*IL-1*)

TECNICA CHIRURGICA

In anestesia generale, attraverso un accesso artrotomico al ginocchio, con apposito strumentario (trapano con mirino e punta drilling) è stata eseguita una lesione di basso grado di 5 mm di diametro, nella porzione centrale del condilo femorale mediale dx. Analogamente, è stato operato il ginocchio controlaterale. Dopo sutura e risveglio, ad ogni animale sono stati somministrati antidolorifici ed antibiotici per 5 giorni, ed è stato concesso il carico immediatamente dopo l'intervento.

- A 30 giorni dall'intervento è stata eseguita un'infiltrazione, al solo ginocchio dx, utilizzando fattori di crescita PRP precedentemente stoccati a -70°.
- A 45 giorni è stata eseguita la seconda infiltrazione al ginocchio dx
- A 60 giorni è stata eseguita la terza infiltrazione di PRP al ginocchio dx

Fase di valutazione della cartilagine:

A 4 mesi dall'intervento chirurgico gli animali sono stati sacrificati, procedendo all'espanto dei femori operati. La soluzione utilizzata per il sacrificio è il Tanax (Intervet- Italia S.r.l., Peschiera Borromeo, Milan, Italy) somministrato in anestesia generale. I campioni sono poi stati inviati al laboratorio per la

valutazione della riparazione della cartilagine.

E' stata effettuata una iniziale valutazione macroscopica, prendendo in considerazione, le caratteristiche della superficie e la sua continuità con il tessuto circostante. Abbiamo quindi valutato l'aspetto globale dell'articolazione per controllare la presenza di artrosi iniziale o conclamata.

I campioni prelevati dopo la valutazione macroscopica sono stati fissati in una soluzione al 10% di formalina tamponata e decalcificati con NOVA DECALC. I campioni fissati in paraffina creando sezioni di 5-6 micro millimetri di spessore e fissati con blue di toluidina per la valutazione morfologica delle cellule, e con safranina O e sirius red per valutare la matrice dei proteoglicani e il collagene nella matrice al microscopio polarizzato. E' stata utilizzata inoltre la colorazione con alcian blue per valutare la produzione di proteoglicani. La valutazione istologica e morfologica è stata eseguita in collaborazione il Laboratorio di Immunologia e Genetica e con il Servizio di Chirurgia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli.

RISULTATI

Tutti gli animali hanno tollerato bene l'intervento chirurgico e sono sopravvissuti nel postoperatorio. Le funzioni vitali erano stabili e non si sono verificate complicanze di carattere generale. La deambulazione è stata ripresa normalmente in assenza di zoppia e il ginocchio era stabile. Nelle prime ore dopo l'intervento si è evidenziato un aumento di volume localizzato nel sito dell'intervento, l'intervento non ha compromesso la stabilità articolare in nessun soggetto.

Dopo la preparazione del PRP è stata valutata la concentrazione dei principali valori di crescita TGF β 1, PDGF AB, IL-1 β , prima e dopo la concentrazione e dopo l'aggiunta dell'attivatore (Calcio citrato). I valori sono riportati in Tab.5

	N. piastrine x10³/μl	TGFβ1 ng/ml	PDGF AB ng/ml	IL-1 ng/ml
PLASMA	294 \pm 48	61 \pm 4	58 \pm 11	1.6 \pm 0.8
PRP	890 \pm 63	109 \pm 38	90 \pm 8	3.6 \pm 0.5
PRP ATT.	-	441 \pm 95	251 \pm 72	9.4 \pm 1.7

Tab. 5 Valori delle citochine proinfiammatorie riscontrate all'interno del PRP dopo la concentrazione

La valutazione macroscopica non ha riscontrato segni di infezione, limitazione del range di movimento articolare o sinovite. A 4 mesi dall'intervento le lesioni effettuate apparivano ricoperte da un tessuto di riparazione lucido trasparente, più biancastro e più simile al tessuto sano nell'articolazione in cui era stato addizionato il PRP, dove peraltro i margini sembravano più simili al tessuto adiacente sano (Fig. 13A). Nell'arto sinistro non trattato il letto della lesione appariva più depresso ed erano più evidenti i margini della lesione (Fig. 13B).

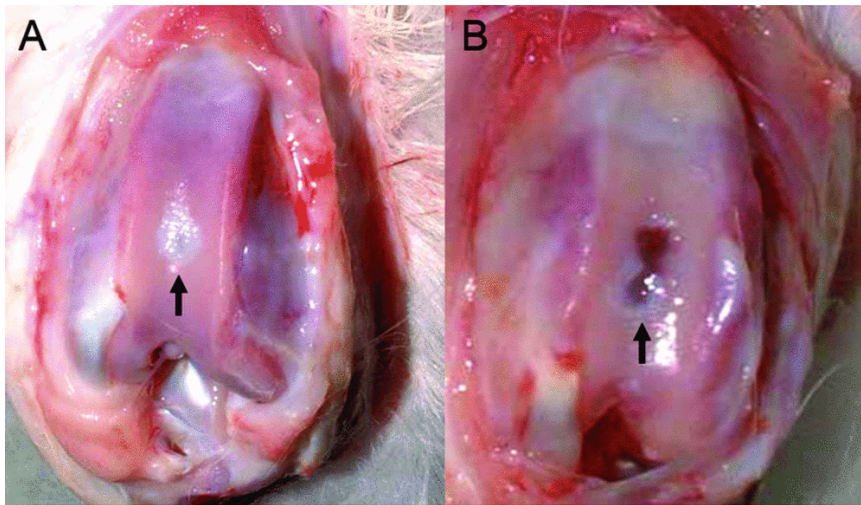


Fig. 13 Aspetto macroscopico della lesione osteocondrale, controllo a 4 mesi A) Gruppo trattato con PRP, B) Gruppo controllo

La valutazione istologica a 4 mesi ha evidenziato come nell'arto non trattato, la sede della lesione era ricoperta da tessuto fibroso, la cui struttura appariva interrotta da profonde fessure. Nel gruppo trattato con PRP i difetti sono colmati da tessuto rigenerato più simile alla cartilagine ialina, soprattutto in corrispondenza dei margini della lesione, in cui è possibile apprezzare la disposizione colonnare nella zona più profonda della cartilagine. Nella porzione centrale il tessuto che ricopre la lesione sembra tuttavia più simile alla fibrocartilagine. Comunque appare chiaro come la lesione sia stata completamente rivestita da tessuto di riparazione più consistente, e dalla composizione più simile a quello della cartilagine ialina rispetto al gruppo di controllo. Inoltre utilizzando le colorazioni blu di toluidina e Safranina O abbiamo notato la presenza di abbondante matrice extracellulare di origine cartilaginea, e con colorazioni immunoistochimiche, la presenza di Collagene di tipo II. In questo gruppo i condrociti sono evidenti, accompagnati dalla caratteristica struttura lacunare.

Al di sotto del sito di lesione è possibile notare uno strato continuo di osso trabecolare, anche se presente in entrambi i gruppi, questo appare

completamente integro solo nel gruppo trattato con PRP. Nel gruppo controllo (arto controlaterale) si possono notare all'interno dell'osso subcondrale delle lacune ossee non ancora completamente chiuse.

Nel gruppo controllo la quantità di Collagene tipo II era scarsa e la matrice extracellulare neoformata era notevolmente inferiore.

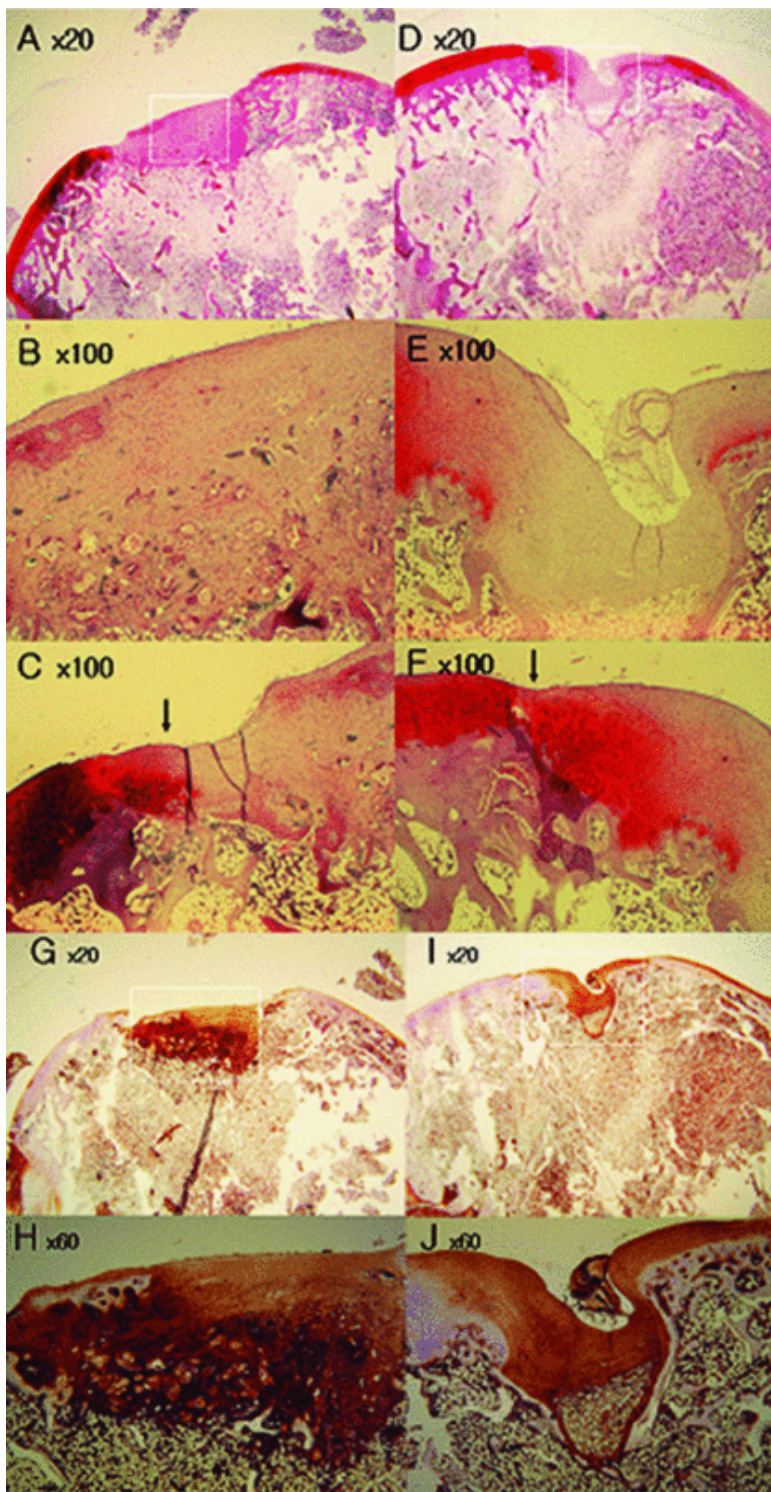


Figura 14 Osservazione al microscopio ottico della sede di lesione a 12 mesi: (A–F) Colorazione con Safranina-O: (A–C) Gruppo A: trattato con PRP; (D–F) Gruppo B: Controllo (G–J) Colorazione immunohistochimica per il collagene tipo II: (G and H) Gruppo A; (I and J) Gruppo B. (B), (E), (H) e (J) sono ingrandimenti di particolari dei riquadri (A), (D), (G) and (I) . (C) ed (F) mostrano la giunzione tra la sede di lesione e la normale cartilagine.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'ipotesi di questo studio era che il PRP promuovesse la guarigione delle lesioni osteocondrali di dimensioni critiche (medio-grandi). I risultati dimostrano come il tessuto neoformato sia più simile alla cartilagine normale nell'arto trattato con PRP. Il PRP ha notevoli vantaggi tra i quali l'assenza di risposte immunitarie da parte del paziente e la facilità d'impiego, inoltre non è mai stato collegato all'insorgenza di tumori o neoformazioni. L'uso del PRP in aggiunta sembra avere costi che sono accessibili a qualsiasi struttura ospedaliera, sicuramente più semplice da utilizzare rispetto a tutte le terapie finora proposte. Soprattutto nelle lesioni di grado 1 o 2, meno nell'artrosi severa, sembrano in grado di favorire il ripristino dell'omeostasi tissutale. L'uso di PRP autologo ha un sempre più largo impiego in odontoiatria, in chirurgia maxillofaciale e in ortopedia. Recentemente alcuni studi hanno evidenziato come il PRP sia in grado di stimolare la proliferazione cellulare dei condrociti e la produzione di matrice extracellulare in vitro.⁸⁹

Variazioni quantitative o qualitative delle piastrine possono influire sul potenziale rigenerativo del PRP, in questo studio abbiamo appositamente valutato la concentrazione delle piastrine prima e dopo la concentrazione e abbiamo valutato l'efficacia nell'incremento dei principali fattori di crescita (TGF β 1, PDGF AB, IL-1 β). Questo ci ha permesso di considerare il PRP da noi utilizzato adeguato per lo studio.

Lo studio inoltre ha permesso di verificare la sede di lesione con studio macroscopico e istologico. Già all'esame macroscopico, l'aspetto della lesione appariva diverso nei due gruppi, e per i valutatori non è stato difficile riconoscere le articolazioni trattate con PRP dal gruppo controlaterale. Le lesioni non trattate con PRP avevano un aspetto più pallido e meno spesso e all'esame istologico apparivano ricoperte di fibrocartilagine con scarsa matrice extracellulare. Questo ha suggerito che i fattori di crescita, rilasciati dagli alfa granuli delle piastrine concentrate, hanno un ruolo fondamentale nel processo di riparazione della cartilagine. In questo studio si è evidenziato anche come a

ridosso dei margini di lesione l'integrazione sia avvenuta molto meglio nel gruppo trattato con PRP. Questo fa pensare ad un attivazione diretta anche della cartilagine sana circostante la lesione, come mostrato da alcuni eseguiti in vitro.⁸⁹ Inoltre ci può essere una stimolazione diretta delle cellule dell'osso subcondrale, dovuto ad un richiamo delle cellule mesenchimali totipotenti presenti all'interno del midollo osseo che, come dimostrato nello studio di Anja Drengk's, vengono stimulate alla differenziazione condrogenica e alla proliferazione.⁹⁰ In aggiunta a questo la guarigione dell'area sottostante sottolinea l'importanza di questo processo di guarigione che partirebbe dal substrato osseo per supportare la cartilagine neoformata. Nel nostro studio il substrato osseo subcondrale del gruppo trattato con PRP era notevolmente più omogeneo se paragonato a quello del gruppo non trattato in cui erano ancora evidenti delle zone in cui la trabecolatura non era ancora completamente formata. All'interno dell'osso subcondrale del gruppo trattato con PRP è possibile osservare all'interno dello strato superficiale continuo, la presenza di zone di neoformazione ossea, assenti nel gruppo controllo, evidenziando come il PRP abbia anche un'azione sulla neoformazione ossea.

In conclusione riteniamo che questo studio abbia evidenziato le capacità rigenerative del PRP sia sul tessuto cartilagineo che su quello subcondrale. Lo studio per come concepito, isola molte delle variabili che normalmente interferiscono sullo studio. Lesioni eseguite sullo stesso animale contemporaneamente escludono differenze istologiche, morfologiche o biomeccaniche interindividuali, esaltando la validità dei risultati. Nonostante i limiti dello studio dovute alla disponibilità di un numero limitato di soggetti di piccole dimensioni, riteniamo che l'utilizzo del PRP nelle lesioni osteocondrali vada implementato in vivo con studi preclinici e clinici più completi, per comprendere appieno le sue potenzialità e per delineare protocolli più efficaci rispetto agli attuali.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ (2005) Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 54:465–480
- ² Loeser RF Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. 2010; *Clin Geriatr Med* 26:371–386
- ³ Goldring MB, Goldring SR Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2007; 213:626–634
- ⁴ Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E (2010) The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:434–447
- ⁵ Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2010; 18:419–433
- ⁶ van Dijk CN, Tol JL, Struijs PAA Complications, rehabilitation and results of arthroscopic meniscectomy and meniscal repair: a review of the literature. *J Sports Traumatol rel res* 1997; 19:43–50
- ⁷ Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobnic M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, Van Dijk CN. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012; 20:423–435
- ⁸ Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res*. 2011 Jun;29(6):802-9. doi: 10.1002/jor.21359. Epub 2011 Feb 11.
- ⁹ Boopalan PR, Sathishkumar S, Kumar S, Chittaranjan S Rabbit articular cartilage defects treated by allogenic chondrocyte transplantation. *Int Orthop* 2006; 30:357–361
- ¹⁰ Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone J Surg Am* 2003; 85:17–24
- ¹¹ Bullough PG Joints. In: Mills SE (ed) *Histology for pathologists*, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007; pp 97–121
- ¹² Loeser RF Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr Cartil* 2009; 17:971–979
- ¹³ Goldring MB, Goldring SR Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2007, 213:626–634
- ¹⁴ Clouet J, Vinatier C, Merceron C, Pot-vaucel M, Maugars Y, Weiss P, Grimandi G, Guicheux J. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today*. 2009 Oct;14(19-20):913-25.

-
- ¹⁵ Eyre DR, Wu JJ. Collagen structure and cartilage matrix integrity. *J Rheumatol Suppl.* 1995 Feb;43:82-5.
- ¹⁶ Buckwalter JA, Martin JA, Brown TD Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. *Biorheology* 2006; 43:603–609
- ¹⁷ Loeser RF Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr Cartil*; 2009 17:971–979
- ¹⁸ Loeser RF Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*; 2010 26:371–386
- ¹⁹ Adams CS, Horton WE Jr Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec* 1998; 250:418–425
- ²⁰ Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*; 2006 54:818–831
- ²¹ Campisi J, di d'Adda FF Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Natl Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:729–740
- ²² Campisi J Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005; 120:513–522
- ²³ Bayliss MT, Osborne D, Woodhouse S, Davidson C Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. *J Biol Chem* 1999; 274:15892–15900
- ²⁴ Dudhia J, Davidson CM, Wells TM, Vynios DH, Hardingham TE, Bayliss MT Age-related changes in the content of the C-terminal region of aggrecan in human articular cartilage. *Biochem J* 1996; 313(Pt 3): 933–940
- ²⁵ Wells T, Davidson C, Morgelin M, Bird JL, Bayliss MT, Dudhia J Age-related changes in the composition, the molecular stoichiometry and the stability of proteoglycan aggregates extracted from human articular cartilage. *Biochem J* 2003; 370:69–79
- ²⁶ Verzijl N, DeGroot J, Ben ZC, Brau-Benjamin O, Maroudas A, Bank RA, Mizrahi J, Schalkwijk CG, Thorpe SR, Baynes JW, Bijlsma JW, Lefeber FP, TeKoppele JM Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:114–123
- ²⁷ DeGroot J, Verzijl N, Bank RA, Lefeber FP, Bijlsma JW, TeKoppele JM Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of

nonenzymaticglycation. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1003–1009

²⁸ Verzijl N, Bank RA, TeKoppele JM, DeGroot J AGEing and osteoarthritis: a different perspective. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:616–622

²⁹ Grushko G, Schneiderman R, Maroudas A Some biochemical and biophysical parameters for the study of the pathogenesis of osteoarthritis: a comparison between the processes of ageing and degeneration in human hip cartilage. *Connect Tissue Res* 1989; 19:149–176

³⁰ Davies CM, Guilak F, Weinberg JB, Fermor B Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 2008; 16: 624–630

³¹ Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R380–R391

³² Yin W, Park JI, Loeser RF Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and MEK-ERK MAPK signaling pathways. *J Biol Chem* 2009; 284:31972–31981

³³ Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994 Oct 6;331(14):889-95

³⁴ Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res*. 2012 Mar;347(3):613-27

³⁵ Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Altadonna G, Marcacci M. Novel nano-composite multi-layered biomaterial for the treatment of multifocal degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009 Nov;17(11):1312-5

³⁶ Sundelacruz S, Kaplan DL. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol*. 2009 Aug;20(6):646-55.

³⁷ Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*. 2006; 10(10):1–5.

³⁸ Barrett S, Erredge S. Growth factors for chronic plantar fascitis. □Podiatry Today. 2004; 17:37–42.

³⁹ Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 2003; 81:646–56.

⁴⁰ Anitua M, Sánchez E, Nurden A, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and

novel applications for platelet-rich fibrin □therapies. *Trends Biotechnol* 2006; 24(5): 227–34.

⁴¹ Praemer AF. Musculoskeletal conditions in the United States. 2nd ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1999.

⁴² Marx R, Garg A. Dental and craniofacial applications of platelet- rich plasma. Carol Stream: Quintessence Publishing Co, Inc.; 2005.

⁴³ Everts P, Knappe J, Weirich G, Schonberger J, Hoffman J, Overdevest E, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a □review. *JECT*. 2006; 38:174–87.

⁴⁴ Messner, K., and Maletius, W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14 year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand* 1996; 67, 165

⁴⁵ Pietrzak W, Eppley B. Scientific foundations platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg*. 2005; 16(6):1043–54

⁴⁶ Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001; 10:225–8

⁴⁷ Smidt N, Assendelft W, Arola H, et al. Effectiveness of physiotherapy for lateral epicondylitis: a systemic review. *Ann Med*. 2003; 35:51–62.

⁴⁸ Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003; 83:835–70.

⁴⁹ Froum SJ, Wallace S, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002; 22:45–53.

⁵⁰ Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem R, Ruben J, Van der Wal J, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for the augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res*. 2005; 16:349–56.

⁵¹ Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004 November; 114(6):1502–8

⁵² Everts P, Knappe J, Weirich G, Schonberger J, Hoffman J, Overdevest E, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *JECT*. 2006; 38:174–87.

⁵³ Ranly D, Lohmann C, Andreacchio D, Boyan B, Schwartz Z. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg*. 2007; 89: 139–46.

⁵⁴ Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*. 2003; 33(5):381–94.

-
- ⁵⁵ Zehnder JL, Leung LLK. Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. *Blood*. 1990; 76:2011–6.
- ⁵⁶ Jackson, D.W., Simon, T.M., and Aberman, H.M. Symptomatic articular cartilage degeneration: the impact in the new millennium. *Clin Orthop Relat Res* 2001; 391 Suppl, S14
- ⁵⁷ Garstang, S.V., and Stitik, T.P. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil* 2006; 85(Suppl 11), S2
- ⁵⁸ Katayama, R., Wakitani, S., Tsumaki, N., Morita, Y., Matsushita, I., Gejo, R., and Kimura, T. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43, 980
- ⁵⁹ Lind, M., Larsen, A., Clausen, C., Osther, K., and Everland, H. Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008; 16, 690
- ⁶⁰ Murphy, J.M., Fink, D.J., Hunziker, E.B., and Barry, F.P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48, 3464
- ⁶¹ Clements, K.M., Ball, A.D., Jones, H.B., Brinckmann, S., Read, S.J., and Murray, F. Cellular and histopathological changes in the infrapatellar fat pad in the monoiodoacetate model of osteoarthritis pain. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17, 805
- ⁶² Gotterbarm, T., Breusch, S.J., Schneider, U., and Jung, M. The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Anim* 2008; 42, 71
- ⁶³ Vacanti, C.A., Langer, R., Schloo, B., and Vacanti, J.P. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88, 753
- ⁶⁴ Gao, F., Koenitzer, J.R., Tobolewski, J.M., Jiang, D., Liang, J., Noble, P.W., and Oury, T.D. Extracellular superoxide dismutase inhibits inflammation by preventing oxidative fragmentation of hyaluronan. *J Biol Chem* 2008; 283, 6058
- ⁶⁵ Majumdar, M.K., Askew, R., Schelling, S., Stedman, N., Blanchet, T., Hopkins, B., Morris, E.A., and Glasson, S.S. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56, 3670
- ⁶⁶ Wu, Q., Kim, K.O., Sampson, E.R., Chen, D., Awad, H., O'Brien, T., Puzas, J.E., Drissi, H., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J., Zuscik, M.J., and Rosier, R.N. Induction of an osteoarthritis-like phenotype and degradation of phosphorylated Smad3 by Smurf2

in transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2008; 58, 3132

⁶⁷ Fitzgerald, J., Rich, C., Burkhardt, D., Allen, J., Herzka, A.S., and Little, C.B. Evidence for articular cartilage regeneration in MRL=MPJ mice. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16, 1319

⁶⁸ Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair *Tissue Eng Part B Rev.* 2010; Feb;16(1):105-15.

⁶⁹ Ferretti, M., Marra, K.G., Kobayashi, K., Defail, A.J., and Chu, C.R. Controlled in vivo degradation of genipin crosslinked polyethylene glycol hydrogels within osteochondral defects. *Tissue Eng* 2006; 12, 2657

⁷⁰ Kessler M.W., Ackerman, G., Dines, J.S., and Grande, D. Emerging technologies and fourth generation issues in cartilage repair. *Sports Med Arthrosc* 2008; 16, 246

⁷¹ Libbin R.M., and Rivera, M.E. Regeneration of growth plate cartilage induced in the neonatal rat hindlimb by reamputation. *J Orthop Res* 1989; 7, 674

⁷² Watrin-Pinzano A., Ruaud, J.P., Cheli, Y., Gonord, P., Grossin, L., Gillet, P., Blum, A., Payan, E., Olivier, P., Guillot, G., Netter, P., and Loeuille, D. T2 mapping: an efficient MR quantitative technique to evaluate spontaneous cartilage repair in rat patella. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12, 191

⁷³ Chu, C.R., Douchis, J.S., Yoshioka, M., Sah, R.L., Coutts, R.D., and Amiel, D. Osteochondral repair using perichondrial cells. A 1-year study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1997; 340, 220

⁷⁴ Furukawa, T., Eyre, D.R., Koide, S., and Glimcher, M.J. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 62, 79, 1980.

⁷⁵ Kawamura, S., Wakitani, S., Kimura, T., Maeda, A., Caplan, A.I., Shino, K., and Ochi, T. Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand* 1998; 69, 56

⁷⁶ Wei X., Gao, J., and Messner, K. Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint. *J Biomed Mater Res* 1997; 34, 63

⁷⁷ Shapiro F., Koide S., and Glimcher M.J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75, 532

⁷⁸ Rasanen, T., and Messner, K. Regional variations of indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage. *J Biomed Mater Res* 1996; 31, 519

⁷⁹ Buma, P., Pieper, J.S., van Tienen, T., van Susante, J.L., van der Kraan, P.M., Veerkamp, J.H., van den Berg, W.B., Veth, R.P., and van Kuppevelt, T.H. Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular

cartilage defects—a study in rabbits. *Biomaterials* 24, 3255, 2003.

⁸⁰ Han, C.W., Chu, C.R., Adachi, N., Usas, A., Fu, F.H., Huard, J., and Pan, Y. Analysis of rabbit articular cartilage repair after chondrocyte implantation using optical coherence tomography. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11, 111

⁸¹ Ahern, B.J., Parvizi, J., Boston, R., and Schaer, T.P. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17, 705

⁸² Kangarlu, A., and Gahunia, H.K. Magnetic resonance imaging characterization of osteochondral defect repair in a goat model at 8 T. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14, 52

⁸³ Niederauer, G.G., Slivka, M.A., Leatherbury, N.C., Korvick, D.L., Harroff, H.H., Ehler, W.C., Dunn, C.J., and Kieswetter, K. Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. *Biomaterials* 2000; 21, 2561

⁸⁴ Ahern, B.J., Parvizi, J., Boston, R., and Schaer, T.P. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17, 705

⁸⁵ Jackson, D.W., Lalor, P.A., Aberman, H.M., and Simon, T.M. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83A, 53

⁸⁶ Niederauer, G.G., Slivka, M.A., Leatherbury, N.C., Korvick, D.L., Harroff, H.H., Ehler, W.C., Dunn, C.J., and Kieswetter, K. Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. *Biomaterials* 2000; 21, 2561

⁸⁷ Butnariu-Ephrat, M., Robinson, D., Mendes, D.G., Halperin, N., and Nevo, Z. Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow. *Clin Orthop Relat Res* 1996; 330, 234

⁸⁸ Brehm, W., Aklin, B., Yamashita, T., Rieser, F., Trub, T., Jakob, R.P., and Mainil-Varlet, P. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14, 1214

⁸⁹ Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ, et al. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14:1272–1280

⁹⁰ Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch KH Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(5):317-26.